

УДК 61.612.34

## НИЗКИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ УАБАИНА СТИМУЛИРУЮТ ФОРМИРОВАНИЕ ЭПИТЕЛИАЛЬНОГО БАРЬЕРА В ЛИНИИ КЛЕТОК IPES-J2

© 2019 г. А. А. Федорова<sup>1</sup>, V. Cornelius<sup>2</sup>, S. Amasheh<sup>2</sup>, И. И. Кривой<sup>1</sup>, А. Г. Марков<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Institute of Veterinary Physiology, Department of Veterinary Medicine, Freie Universität, Berlin, Germany

\*e-mail: markov\_51@mail.ru

Поступила в редакцию 14.09.2018 г.

После доработки 04.10.2018 г.

Принята к публикации 04.02.2019 г.

DOI: 10.1134/S0044452919030069

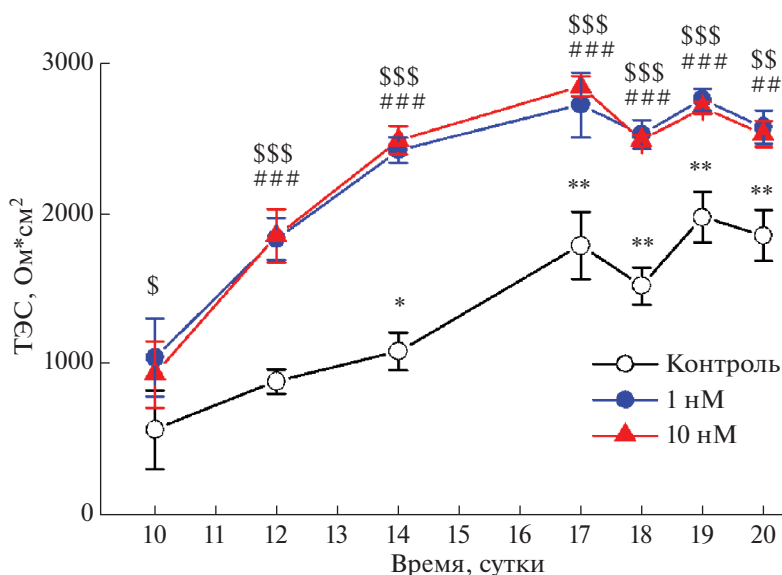
Na,K-АТФаза — интегральный белок, поддерживающий трансмембранные градиенты  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  за счет активного транспорта этих ионов, что обеспечивает мембранный потенциал и возбудимость, а также ряд других транспортных механизмов клетки. Кроме того, благодаря ряду структурных доменов Na,K-АТФаза способна образовывать мультимолекулярные комплексы и участвовать в качестве скаффолда в формировании функциональных микродоменов клетки, межклеточных взаимодействиях, а также выполнять регуляторную и сигнальную функции [1]. В эпителиальных клетках Na,K-АТФаза не только участвует в осуществлении транспортных свойств этих клеток, но является также важным регулятором фенотипа эпителия. Эта способность обеспечивается тем, что Na,K-АТФаза участвует в формировании плотных контактов, в регуляции их молекулярной организации и проницаемости [2, 3]. В качестве основного инструмента в таких исследованиях применяют ингибитор Na,K-АТФазы уабаин, специфическим рецептором для которого является  $\alpha$ -субъединица Na,K-АТФазы. В настоящее время доказано существование эндогенного аналога уабаина, который синтезируется в коре надпочечников и в гипоталамусе, циркулирует в наномолярном диапазоне концентраций и рассматривается в качестве важного физиологического регулятора [1].

Уабаин в наномолярных концентрациях, блокируя активность Na,K-АТФазы, нарушает молекулярную организацию плотных контактов в эпителиальных клетках и вызывает снижение трансэпителиального сопротивления (ТЭС) [2]. Напротив, уабаин в наномолярных концентрациях, сопоставимых с уровнем эндогенного уабаина, оказывает противоположное действие, сопровождающееся увеличением ТЭС. Такие эффекты уабаина показаны в клеточной линии почки собаки (MDCK II) [2] и клетках Сертоли [3], что подтвер-

ждает возможность участия эндогенного уабаина в регуляции фенотипа эпителия. В настоящей работе мы впервые исследовали влияние уабаина в наномолярных концентрациях на ТЭС с использованием линии клеток тощей кишки свиньи (IPES-J2), которые рассматривают как перспективную модель для изучения процессов в желудочно-кишечном тракте человека [4].

Клетки IPES-J2 были культивированы в среде DMEM/F12 (1:1), содержащей стабильный глутамин (Biochrom, Germany), а также дополненный 1% раствором антибиотиков пенициллина и стрептомицина и 10%-ой сывороткой крови свиньи (Biochrom). Культура клеток была выращена при температуре 37°C в атмосфере 5%  $\text{CO}_2$ . Клетки ( $3 \times 10^6$  клеток/посев) были высеяны на специализированные мембранные фильтры диаметром 12 мм, размером пор 0.4 мкм (Merck Millipore Ltd., Darmstadt, Germany). Клетки культивировали в среде без уабаина (контроль), а также в средах, содержащих уабаин (1, 10 и 100 нМ). Замена среды проводилась каждые два-три дня. ТЭС измеряли при помощи усилителя EVOM (World Precision Instruments, USA). Все приемы работы соответствовали нормам международного и российского законодательства. Статистический анализ проводился с использованием множественного t-теста в программном обеспечении GraphPad Prism версия 6.01 (Graphpad Software Inc., SanDiego, CA, USA). Для обработки данных все значения ТЭС были нормализованы по площади фильтра; величины сопротивлений раствора и фильтра вычитались из зарегистрированных значений. В тексте и на рисунках приведены средние значения величин с их ошибками ( $m \pm \text{SEM}$ ). Уровень значимости  $p < 0.05$  принимался как статистически значимый. Уабаин и все прочие применяемые вещества были производства Sigma-Aldrich.

В контроле наблюдалось постепенное увеличение значений ТЭС от  $570 \pm 260$  до  $1790 \pm 220$  Ом · см<sup>2</sup>



**Рис. 1.** Стимуляция формирования эпителиального барьера убаином. Изменение трансэпителиального сопротивления (ТЭС) клеток ИРЕС-J2 в ходе их инкубации в контрольной среде (светлые кружки), в присутствии убаина в концентрациях 1 нМ (темные кружки) и 10 нМ (треугольники). По оси абсцисс – время инкубации, сутки; по оси ординат – величина ТЭС, Ом · см<sup>2</sup>. Достоверность различий: \*  $p < 0.05$  и \*\*  $p < 0.01$  – по сравнению с 10-м днем культивирования в контрольной среде; §  $p < 0.05$ , §§  $p < 0.01$ , §§§  $p < 0.001$  и ##  $p < 0.01$ , ###  $p < 0.001$  для ТЭС в среде с убаином (1 и 10 нМ соответственно) – по сравнению с аналогичным периодом в контроле.

( $n = 5$ ), зарегистрированных соответственно на 10-й и 17-й день культивирования; в дальнейшем изменений не происходило (рис. 1). В присутствии убаина в концентрации 1 нМ такая динамика сохранялась, однако наблюдалось существенное и достоверное увеличение ТЭС по сравнению с контролем (рис. 1). Величины ТЭС составили  $1050 \pm 260$  Ом см<sup>2</sup> и  $2720 \pm 210$  Ом · см<sup>2</sup> ( $n = 6$ ) на 10-й и 17-й дни культивирования соответственно. Убаин в концентрации 10 нМ вызывал аналогичный эффект (рис. 1). В присутствии 100 нМ убаина ТЭС не было зарегистрировано. Это может отражать токсическое (обусловленное ингибированием активности Na,K-АТФазы) действие убаина, препятствующее образованию конфлюэнтного монослоя клеток. Аналогичное снижение ТЭС до нуля наблюдалось также в клетках линии MDCK II при действии 1 мкМ убаина и сопровождалось дезорганизацией плотных контактов [2]. Увеличение ТЭС при действии 10 нМ убаина также наблюдали в экспериментах с уже сформировавшимся монослоем клеток линии MDCK II [2] и клеток Сертоли [3]. Наши данные впервые показывают, что убаин в наномолярных концентрациях способен эффективно влиять на процесс формирования барьерных свойств эпителия.

Обсуждается возможность реализации эффектов наномолярных концентраций убаина через активацию Na,K-АТФазы и изменение ионного баланса [5]. Однако имеющиеся данные подтверждают скорее Src-зависимый сигнальный меха-

низм регуляции фенотипа эпителия убаином [2, 3]. По современным представлениям Na,K-АТФаза функционирует не только как ионный насос, но и участвует также в мембранной и внутриклеточной сигнальной трансдукции. Наиболее изученным белком в реализации сигнальной функции Na,K-АТФазы является Src-киназа [1]. Оба эти белка имеют специализированные структурные домены, обеспечивающие их прямое взаимодействие друг с другом, и являются компонентами мультимолекулярного сигнального комплекса. Предполагается, что функциональный комплекс Na,K-АТФаза/Src-киназа исходно находится в неактивном состоянии. Связывание молекулы убаина с  $\alpha$ -субъединицей Na,K-АТФазы вызывает такое изменение конформации фермента, которое через комплекс с Src-киназой передается белкам окружения и запускает ряд сигнальных внутриклеточных каскадов.

Важно отметить, что снижение проницаемости эпителия при действии убаина в низких концентрациях реализуется, прежде всего, за счет усиления экспрессии клаудинов [2, 3] – основных белков, определяющих парацеллюлярную проницаемость и барьерные свойства эпителия [6]. Так, убаин в наномолярных концентрациях вызывал усиление экспрессии клаудина-1, -2 и -4 в клетках линии MDCK II [2] и клаудина-1 и -11 в клетках Сертоли [3]. Поскольку  $\alpha$ -субъединица Na,K-АТФазы является единственным известным рецептором для убаина [1], имеющиеся данные подтверждают существование функциональной связи между

Na,K-АТФазой и клаудинами и ее возможную роль в физиологическом механизме регуляции фенотипа эпителия эндогенным убаином. В клетках линии IPEC-J2 экспрессируются клаудин-1, -3, -4, -5, -7 и -8 [4]. Выяснение индивидуального участия этих клаудинов, а также возможной роли натриевого баланса и эпителиальных натриевых каналов (ENaC) [7], в наблюдаемых нами эффектах убаина требует специального анализа.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 18-15-00043.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов изучения.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Matchkov V.V., Krivoi I.I. Specialized Functional Diversity and Interactions of the Na,K-ATPase // *Front. Physiol.* 7: 179. 2016. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00179>
2. Larre I., Lazaro A., Contreras R.G., Balda M.S., Matter K., Flores-Maldonado C., Ponce A., Flores-Benitez D., Rincon-Heredia R., Padilla-Benavides T., Castillo A., Shoshania L., Cerejido M. Ouabain modulates epithelial cell tight junction // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107: 11387–11392. 2010. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000500107>
3. Dietze R., Shihan M., Stammer A., Konrad L., Scheiner-Bobis G. Cardiotonic steroid ouabain stimulates expression of blood–testis barrier proteins claudin-1 and -11 and formation of tight junctions in Sertoli cells // *Mol. Cell. Endocrinol.* 405: 1–13. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.02.004>
4. Zakrzewski S.S., Richter J.F., Krug S.M., Jebautzke B., Lee I.-F.M., Rieger J., Sachtleben M., Bondzio A., Schulzke J.D., Fromm M., Günzel D. Improved Cell Line IPEC-J2, Characterized as a Model for Porcine Jejunal Epithelium // *PLoS ONE.* 8 (11): e79643. 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079643>
5. Orlov S.N., Klimanova E.A., Tverskoi A.M., Vladychenskaya E.A., Smolyaninova L.V., Lopina O.D. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-Dependent and Independent Signaling Triggered by Cardiotonic Steroids: Facts and Artifacts // *Molecules.* 22 (4): 635. 2017. <https://doi.org/10.3390/molecules22040635>
6. Markov A.G., Aschenbach J.R., Amasheh S. Claudin clusters as determinants of epithelial barrier function // *IUBMB Life.* 67: 29–35. 2015. <https://doi.org/10.1002/iub.1347>
7. Amasheh S., Milatz S., Krug S.M., Bergs M., Amasheh M., Schulzke J.D., Fromm M. Na<sup>+</sup> absorption defends from paracellular back-leakage by claudin-8 upregulation // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 378 (1), 45–50. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.10.164>

## Low Ouabain Concentrations Stimulate Epithelial Barrier Formation in IPEC-J2 Cells

A. A. Fedorova<sup>a</sup>, V. Cornelius<sup>b</sup>, S. Amasheh<sup>b</sup>, I. I. Krivoi<sup>a</sup>, and A. G. Markov<sup>a, #</sup>

<sup>a</sup> St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

<sup>b</sup> Institute of Veterinary Physiology, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany

<sup>#</sup>e-mail: markov\_51@mail.ru